

## 成熟ラットの過排卵誘起に関する研究

著者	利部 聡
号	327
発行年	1986
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/17031">http://hdl.handle.net/10097/17031</a>

氏 名(本籍) 利 部 聰

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 327 号

学位授与年月日 昭和 62 年 3 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 成熟ラットの過排卵誘起に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 正 木 淳 二 教授 津 田 恒 之

教授 水 間 豊

## 論文内容要旨

ラットの過排卵誘起は、1927年Smith & Engleが行った下垂体の連日移植によって初めて実現した。以来、過排卵誘起処理は人為的多産につながるものとして期待され、実際にいくつかの動物種で成果が得られてきた。さらに近年は、生殖及び発生研究における卵子の需要増加から、哺乳動物の過排卵に関する課題が一層、関心を集めている。しかし、過排卵誘起処理による排卵数はラット1匹当たり最高50前後にとどまっており、今日においても排卵数に関しては、ほとんど進展がみられない。また、同処理の問題としては、排卵数が安定しないことがあげられる。

以上から、本研究は成熟ラットを用いて過排卵誘起処理を行い、排卵数の増加と安定化の条件を見いだそうとした。

### PMSG<sup>(注1)</sup>投与後の卵胞の消長

過排卵誘起処理において、排卵が効率よく起こるかどうかは、ホルモン投与によって卵胞の発育がどのようになるかということと関連があるので、PMSG及びhCG(注2)投与後の卵胞発育を現行法(注3)の条件下で調べた。

観察の結果、卵胞の発育途上には閉鎖を起こしやすい大きさに達する時期(“臨界点”)があり、この“臨界点”を越えて発育した卵胞だけが排卵に至ることが明らかとなった(図1, 表1)。

次にPMSG投与により“臨界点”を通過した、組織切片における径の平均が550 $\mu$ m以上の非閉鎖卵胞の消長を調べた。その結果、“臨界点”を通過した卵胞の数が最高となる時期はPMSG投与後78時間で、現行法におけるhCG投与期よりも24時間遅いことがわかった。このことから、現行法ではPMSGの卵胞発育効果を十分に発揮できない時期にhCGを投与していることが明らかになった(図2)。

### 過排卵誘起処理におけるペントバルビタール(PB)塩の併用

排卵に至るための大きさをそなえた卵胞数は、PMSG投与後78時間で最高となり、ラット1匹当たり110となる。しかし、その時期に合わせてhCGを投与しても排卵数は平均35で、現行法より少なかった。この原因は、LH(注4)が卵胞を黄体化=閉鎖化することによるのではないかと考え、hCG投与時期までLHの感作を受けないように抗LH血清を投与した。しかし排卵数はこの処置によっても増加しなかった。(表2)。

卵胞の発育にはFSH(注5)とともにLHも必要とすることから、この結果は、抗LH血清によってLHの影響が完全に除去されたため卵胞が閉鎖化し、排卵に至らなかったものと考えた。そこで、卵

---

注1 PMSG: 妊馬血清性性腺刺激ホルモン。

注2 hCG: ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン。

注3 現行法: PMSG注射後54時間にhCGを投与して排卵させる過排卵誘起処理法。排卵数は約50。

注4 LH: 黄体形成ホルモン。PMSG投与後54時間に分泌される。

注5 FSH: 卵胞刺激ホルモン。

胞を發育させながらLHの影響を部分的に除去して、黄体化⇌閉鎖化を起こさせないようにするため、ペントバルビタール塩によってLHの排卵性分泌だけの抑制を試みた。その結果、排卵数は飛躍的に増加した(表3)。

## ペントバルビタール塩併用による過排卵誘起機序の 定量形態学的解析

ラジオイムノアッセイによりPMSG投与ラットにもLHの排卵性分泌が認められたこと、ペントバルビタール塩によってこれを抑制できたことから、ペントバルビタール法(PB法)による排卵数増加は、LHの排卵性分泌が抑制されたことによるとの示唆を得た。これを証明するために卵胞を定量形態学的に観察した。

排卵性分泌を抑制したPMSG投与ラットにLHの代用として0.05～5.00 iuのhCGを投与した結果、閉鎖卵胞へ移行する数が増加した。このことより、非閉鎖卵胞の閉鎖化にLHが支配的に働いていることが明示された(図3)。

## ペントバルビタール法の効果発現

図4にペントバルビタール法の効果発現機序を模式的に示した。PMSGを投与すると、その卵胞發育作用によって、卵胞が大型化する。hCGに反応して排卵に至る卵胞は<sup>\*</sup>臨界点<sup>\*</sup>以上に發育した550 $\mu$ m以上の卵胞であり、この卵胞数が最高となる時期はPMSG投与後78時間で、現行法のhCG投与期よりも24時間遅い。

通常であれば、PMSG投与後78時間を経た550 $\mu$ m以上の卵胞は、発情前期に起こるLHの排卵性分泌によって閉鎖を開始し、hCGに反応しなくなる。しかし、ペントバルビタール塩を投与してLHの排卵性分泌を抑制しておけば卵胞はhCG投与時期まで閉鎖せず、hCGに対する反応性を維持し排卵に至るものと考ええる。

## 過排卵誘起処理後の排卵数の安定化

本研究の目的の一つである排卵数の安定化については、週齢を均一にし、10週齢のような変異の大きい時期のラットの使用をさけることによって、変異を小さくすることができることがわかった。一般に排卵数の安定化のためには、ラットの体重をそろえたり飼養条件を変える等の努力がなされてきたが、本研究により、一般の実験室段階で起こる飼育密度や体重差による影響はほとんどなく、週齢を正しく選べば、安定した排卵数が得られることがわかった。

## 現行法との比較

表4は、個々の項目について本法と現行法を比較検討したものである。

処理法自体については、本法は現行法に比べてペントバルビタール塩を投与する操作が増えるため、若干煩雑となった。しかし、体重とは無関係に1匹当たり10mgのペントバルビタール塩を投与する方法をとれば煩雑さはほとんど解消できることがわかった。

排卵数は現行法の50から100に増加させることができた。排卵卵子が実験材料として利用できるかどうかを検索するために、形態学的観察を行った結果、自然排卵卵子で発生能を持つものに基づいて正常性を判定した場合、本法では異常卵子が3%とやや多くなったが、排卵総数が多いので十分実用に供し得ると考えられた。

以上、過排卵誘起処理におけるペントバルビタール塩の併用は、簡単な操作で排卵数をほぼ2倍に高める効果があった。また、排卵された卵子の正常性も現行法の成績と比べて低くなく、過排卵誘起処理法としてはすぐれていると結論づけられた。

非閉鎖卵胞数/ラット

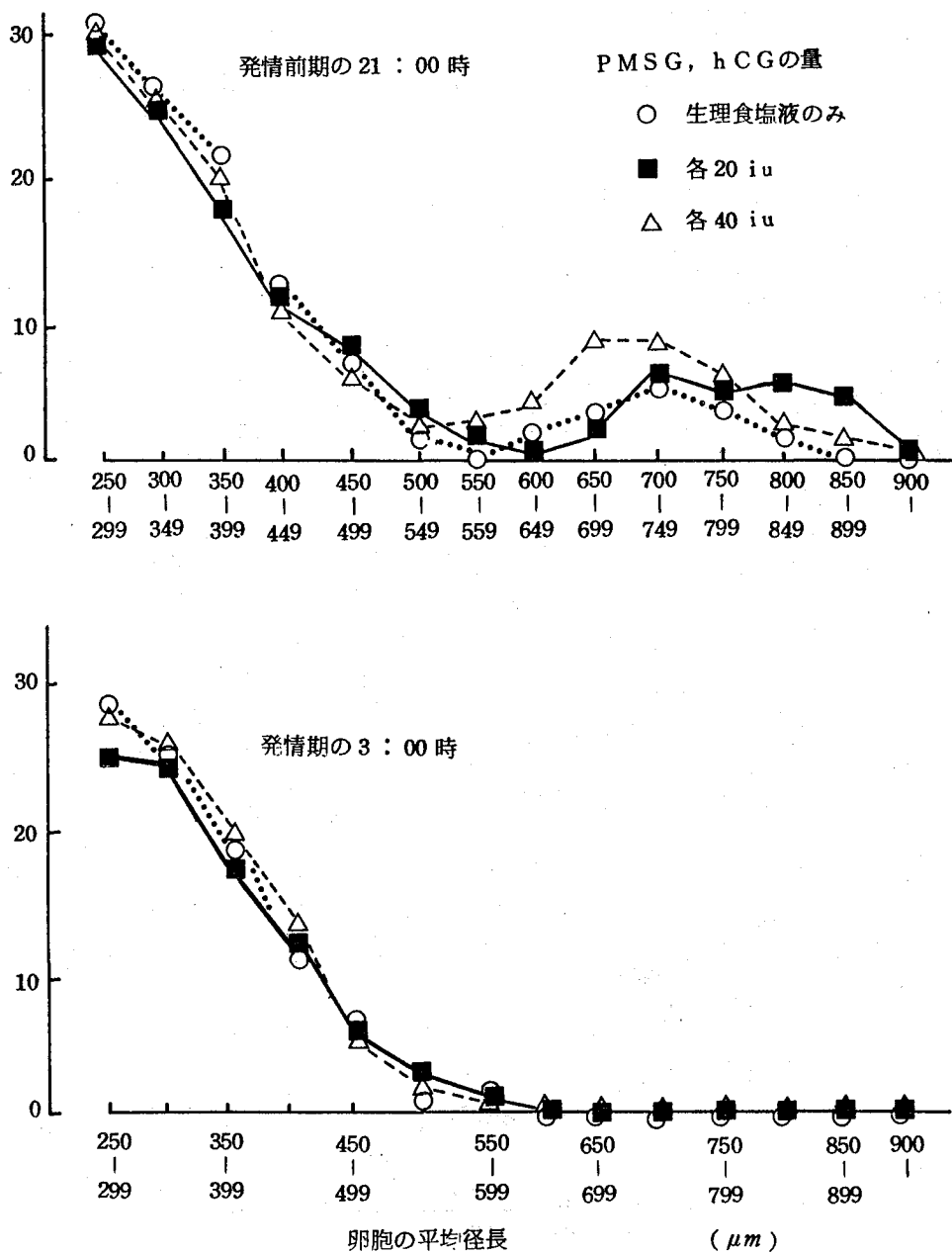


図 1. 過排卵誘起処理と非閉鎖卵胞の消長

表1. 非閉鎖卵胞における卵母細胞の成熟分裂再開

処 理	卵胞の平均径長 ( $\mu\text{m}$ )						%
	250	450	500	550	600	650	
	449	499	549	599	649		
生 食 + 生 食 0.2 ml 0.2 ml	0	0	0	25.0	74.3		100.0
PMSG + hCG 20 iu 20 iu	0	0	0	31.7	83.5		100.0
PMSG + hCG 40 iu 40 iu	0	0	14.0	33.9	98.1		100.0

- 注, 1) PMSG, 生理食塩液の投与は発情後期の9:00時。  
hCG, 生理食塩液の投与は発情前期の15:00時。  
2) 観察時期は, 発情前期の21:00時。

卵胞数/ラット

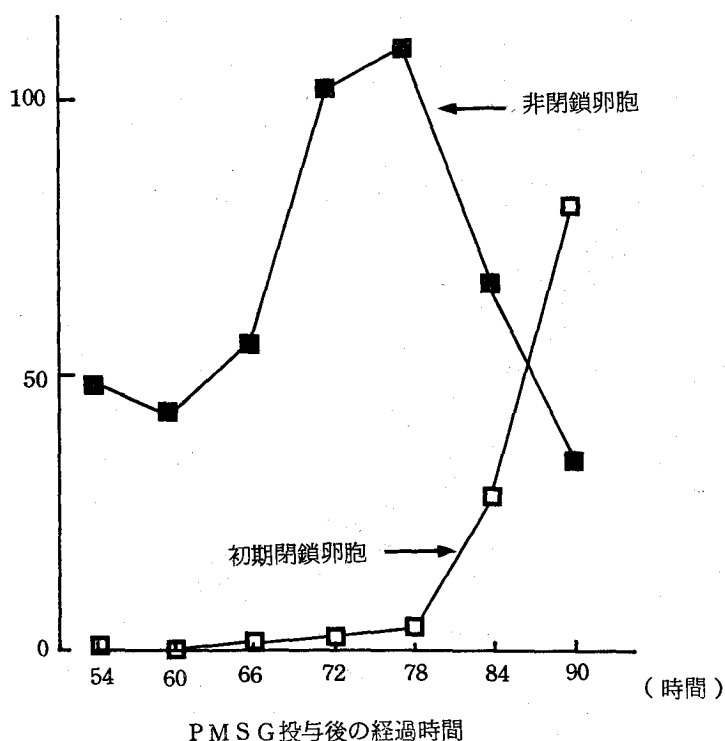


図2. PMSG投与後の大型卵胞数の消長

表2. 卵胞数と排卵数に及ぼす抗LH血清の影響

処 理	550 $\mu$ m以上の		排 卵 数
	非閉鎖卵胞数	閉鎖卵胞数	
	発情期 15.00 時		発情後期 11 : 00 時
PMSG 40 iu 抗LH血清 0.2 ml (hCG 40 iu)	16.5	81.1	0
PMSG 40 iu NRS 0.2 ml (hCG 40 iu)	22.7	79.2	25.1

注, NRS : Nomal rabbit serum

表3. 過排卵誘起処理後の排卵数に及ぼすペントバルビタール(PB)塩投与の影響

処 理			排卵 ラット 供試 ラット	排 卵 数	
発 情 後 期	発 情 前 期	発 情 期		P B 投与 23 時間後	h C G 投与 20 時間後
1 PMSG	生食	生 食	1 / 5	—	1
2 PMSG	生食	h C G	5 / 5	—	20.6 $\pm$ 9.1
3 PMSG	P B	—	0 / 5	0	—
4 PMSG	P B	生 食	1 / 5	—	2
5 PMSG	P B	h C G	5 / 5	—	99.8 $\pm$ 11.4



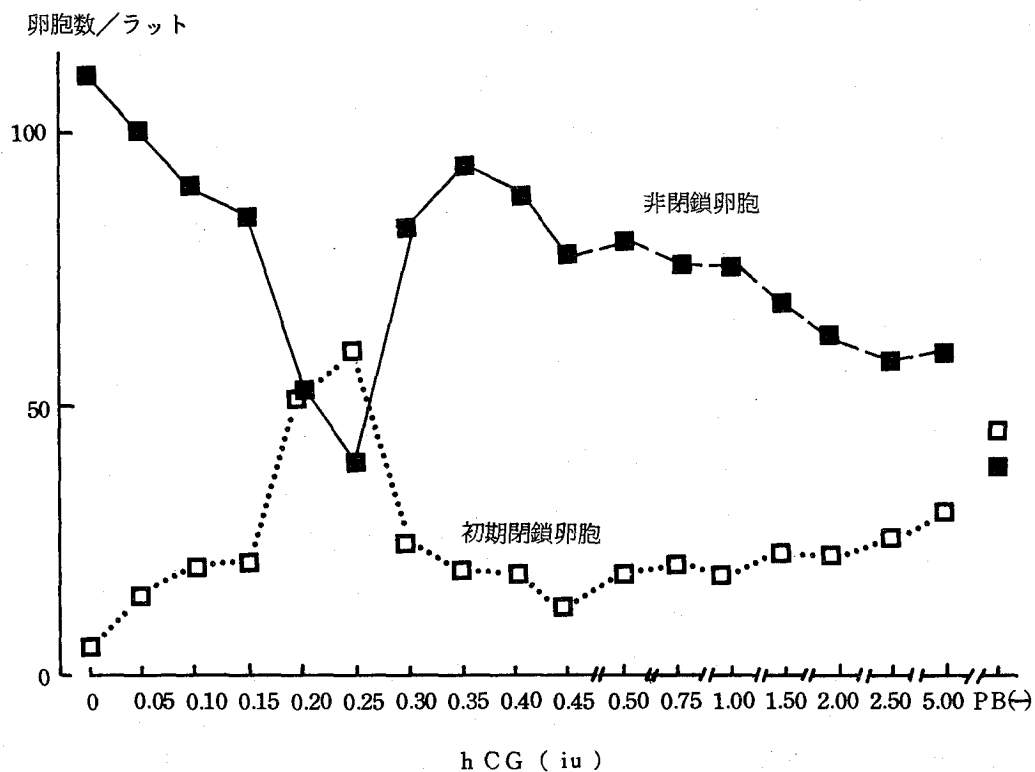


図3. hCGの少量投与が卵胞数に及ぼす影響

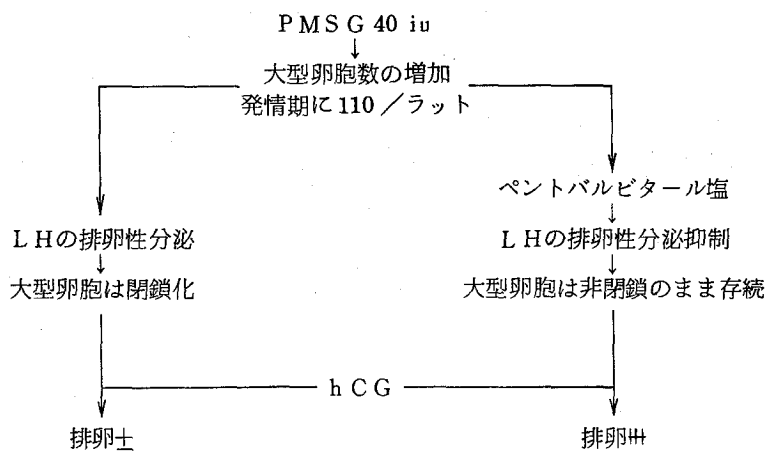
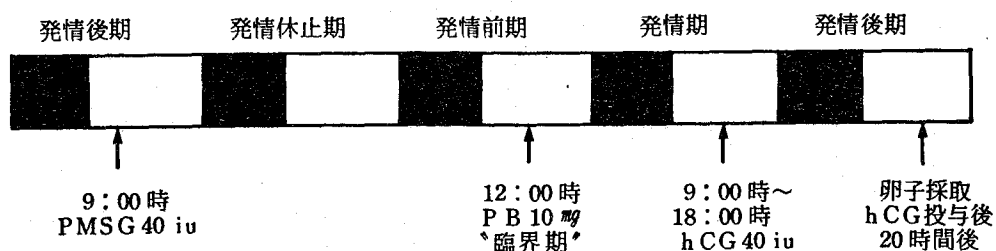


図4. ペントバルビタール法による過排卵誘起の発現機序

表 4. 過排卵誘起処理法の比較

	ペントバルビタール(PB)法	現 行 法	自然排卵
1. 処 理 法	PMSG+PB+hCG	PMSG+hCG	—
2. 最多排卵数	100	50	—
3. 注 射 回 数	3回必要	2回必要	注射不要
4. 処 理 時 間	96～104時間	78時間	—
5. 卵子異常率	3.0%	1.23%	ほぼ0%



使用動物	Wistar・今道系ラット 12 週齢
飼育条件	14 時間；明，10 時間；暗の人工照明
ホルモン，ペント バルビタール塩	PMSG；発情後期 9：00 筋肉内注射 P B；10 時／ラット発情前期 12：00 時腹腔内注射 h C G；発情時 9：00～18：00 時筋肉内注射
卵 子 採 取	h C G 投与後 20 時間

図5. ペントバルビタール (PB) 法によるラットの過排卵誘起処理

## 審 査 結 果 の 要 旨

哺乳動物の過排卵誘起は、下垂体・卵巢系の生理に関する研究課題の一つとしてとりあげられてきたが、近年は発生の研究や受精卵移植技術との関連でも関心を集めている。これまでの研究により、多胎動物のラットでは過排卵処理によって最高50個程度の排卵卵子が得られることが知られている。本研究は、成熟ラットの排卵数をさらに増加させることのできる安定した過排卵条件を見いだそうとした。

まず、過排卵処理後の卵胞の消長をしらべ、現行法の問題点として、PMSG（妊馬血清性性腺刺激ホルモン）の卵胞発育効果を十分に発揮できない時期にhCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）を投与していることを明らかにした。

排卵可能な卵胞数は、PMSG投与後78時間で最高となり、ラット当たり110個にも達する。これをできるだけ多く排卵に導くための検討を重ねた結果、卵胞を発育させながら内因性LHの影響を部分的に除くことの必要性を推察する知見を得た。これを実証するために、ペントバルビタール塩（PB）を投与してLHの排卵性分泌だけの抑制を試みた結果、排卵数は約100個に増加することを見いだした。

排卵数の安定化については、週齢を均一にし、10週齢のような変異の大きい時期は避ける必要があることを明らかにした。

本論文に述べられた成熟ラットの過排卵誘起法は、従来のPMSG+hCGの投与時期を再検討しただけでなく、その間に新たにPB投与を導入することによって排卵数を50個から100個へ増加させる効果を示した。本論文ではPB法の効果発現の機序についても十分な考察を加えており、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与されるに値すると判定した。